

MAYARA LOURDES CARMEL BRAGA

**EFEITO DO AFDX 384, UM ANTAGONISTA DE RECEPTOR
MUSCARINICO M2/M4 DE ACETILCOLINA, NAS ALTERAÇÕES
MOTORAS INDUZIDAS POR DOIS MODELOS
FARMACOLÓGICOS DA DOENÇA DE PARKINSON**

**CAMPO GRANDE– MS
2018**

MAYARA LOURDES CARMEL BRAGA

**EFEITO DO AFDX 384, UM ANTAGONISTA DE RECEPTORES
M2/M4 DE ACETILCOLINA, NAS ALTERAÇÕES MOTORAS
INDUZIDAS POR DOIS MODELOS FARMACOLÓGICOS DA
DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada como exigência para
qualificação e obtenção do título de mestre em
Saúde e desenvolvimento da Região do Centro
Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de
Souza.

**CAMPO GRANDE– MS
2018**

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAYARA LOURDES CAMEL BRAGA

EFEITO DO AFDX 384, UM ANTAGONISTA DE RECEPTORES M2/M4 DE ACETILCOLINA, NAS ALTERAÇÕES MOTORAS INDUZIDAS POR DOIS MODELOS FARMACOLÓGICOS DA DOENÇA DE PARKINSON

Dissertação apresentada como exigência para qualificação e obtenção do título de mestre em Saúde e desenvolvimento da Região do Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Resultado_____

Campo Grande, MS___ de _____ de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Albert Schiaveto de Souza (Presidente)
UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Professor Dr. Alberto Ferreira Donatti
ESTÁCIO DE SÁ

Marcelo Kwiatkoski
UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Alexandra Maria Almeida Carvalho (Suplente)
UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

CAMPO GRANDE– MS
2018

A **Deus**, pela vida, por nos prover sabedoria, discernimento, equilíbrio e força para enfrentar as adversidades.

A minha família. Em especial ao meu pai, **Newton Braga Filho**, minha mãe, **Licéia Lilian Caramel** e meu irmão **Leandro Caramel Braga**. Obrigada por estarem comigo em todos os momentos da realização deste trabalho, grata pelo apoio imprescindível para todas as nossas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, pela oportunidade e por ter colocado pessoas de grande exemplo em meu caminho.

Ao professor Dr. Albert Schiaveto de Souza, orientador desta pesquisa, pela inestimável colaboração, pela disponibilidade e gentileza com que me orientou neste trabalho.

Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação, Laís Caroline Werdemberg, Hudman Cunha Ortiz e Alberto Donatti, por compartilharem conhecimento e pelo auxílio em diferentes fases da pesquisa, a presença de vocês foi memorável.

Ao grupo de Neurociências da UFMS (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul), pelo embasamento para construir esta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento da Região do Centro-Oeste e aos professores do programa, pela oportunidade que me foi concedida, pelo aprimoramento profissional e científico.

A todos os professores que de alguma forma participaram da minha formação, sem cada um deles não seria possível a produção deste trabalho.

Aos meus amigos que estiveram comigo no processo de desenvolvimento deste trabalho. Ao longo deste trabalho pude contar com infinita disponibilidade e companheirismo dos amigos, grata pela presença de todos.

Aos meus pais, Newton Braga Filho e Licéia Lilian Caramel, por acreditarem em mim, por me apoiarem, por não medirem esforços para minha formação como filha, como pessoa e como profissional.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

*“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre os
ombros de gigantes.”*

(Isaac Newton)

BRAGA, Mayara. Lourdes Caramel. **Efeito do AFDX 384, um antagonista seletivo de receptores M2/M4 de acetilcolina, nas alterações motoras induzidas por dois modelos farmacológicos da Doença de Parkinson.** Campo Grande; 2018. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

RESUMO

Introdução: Receptores muscarínicos de acetilcolina (ACh) pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, o subtipo M4 tem sido encontrado em diferentes regiões do cérebro, como córtex e hipocampo, e em abundância no estriado, desempenhando um papel importante no controle motor e no controle da liberação de dopamina na substância negra compacta. **Objetivo:** Analisar o efeito do AFDX 384, um antagonista de receptores M2/M4 de acetilcolina, nas alterações motoras induzidas por dois modelos farmacológicos da doença de Parkinson. **Metodologia:** Neste experimento utilizou-se 96 camundongos suíços, pesando entre 20 e 30 gramas. Os modelos farmacológicos da Doença de Parkinson (DP) utilizados foram o antagonista de receptores de dopamina haloperidol e inibidores da sintase do óxido nítrico (L-norg). Foi utilizado um antagonista de receptores de acetilcolina M2/M4, AFDX 384, nas doses de 2,5mg/kg e 5,0mg/kg. A avaliação funcional dos animais após a aplicação das drogas foi realizada por meio do teste de catalepsia e do teste do campo aberto (CA). **Resultados:** O fármaco AFDX 384, antagonista de M2/M4 de acetilcolina, reduz as alterações motoras induzidas por Haloperidol e L-norg demonstrando um importante papel no comportamento de catalepsia induzida. Conclui-se que o fármaco AFDX 384 reduz a catalepsia e demonstrando melhora no controle motor dos animais, bem como, demonstrou aumento do deslocamento vertical, por si só, no teste do campo aberto.

Palavras-chave: Núcleos da base, Catalepsia, Dopamina, Doença de Parkinson.

ABSTRACT

Introduction: Muscarinic receptors of acetylcholine (ACh) belongs to receptors family couple to protein G, the subtype M4 have been found in different places of brain, like cortex and hippocampus, and fullness in the striatum, performing an important role at the motor control and at the release motor of dopamine at the substantia nigra compact.

Objective: Analyze the effect of AFDX 384, an antagonist of M2/M4 receptors of acetylcholine, in motor changes induced by two pharmacological models of the Parkinson's disease.

Methodology: In this experiment was used 96 swiss mice, weighing between 20 and 30 grams. The pharmacological models from Parkinson's disease (PD) used were the receptors antagonist to dopamine haloperidol and inhibitors from synthase of nitric oxide (L-norg). It was used one antagonist of acetylcholine receptors M2/M4, AFDX 384, at the doses of 2,5mg/kg and 5,0mg/kg. The functional evaluation from animals after an application of drugs was been realized by means of catalepsy test and from open field test (OF).

Results: The pharmacological AFDX 384, M2/M4 antagonist of the acetylcholine, reduce the motor changes induced by Haloperidol and L-norg demonstrating an important role in behavior of induced catalepsy. It is concluded that the pharmacological AFDX 384 reduces catalepsy and demonstrating improvement in the motor control of animals, as well as, demonstrates an increase of vertical displacement, by itself, in the open field test (OF).

Key words: Basal Ganglia, Catalepsy, Dopamine, Parkinson Disease

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação ilustrativa esquemática do experimento I.....	21
Figura 2 - Representação ilustrativa esquemática do experimento II.....	22
Figura 3 - Ilustração do Teste de Catalepsia na barra.....	23
Figura 4 - Ilustração do Teste do campo aberto. Deslocamento horizontal.....	24
Figura 5 - Ilustração do Teste do campo aberto. Deslocamento vertical.....	25
Figura 6 - Gráfico referente ao tempo de catalepsia do experimento I.....	28
Figura 7 - Gráfico referente ao número total de quadrantes percorridos, em cada grupo experimental, no teste de CA (Campo aberto) do experimento I.....	29
Figura 8 - Gráfico referente ao número de permanência em duas patas em cada grupo experimental no teste de CA do experimento I.....	30
Figura 9 - Gráfico referente ao tempo de catalepsia do experimento II.....	31
Figura 10 - Gráfico referente ao número total de quadrantes percorridos, em cada grupo experimental, no teste CA do experimento II.....	33
Figura 11 - Gráfico referente ao número de permanência em duas patas em cada grupo experimental no teste de CA. Do experimento II.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados referentes as variáveis analisadas no teste de catalepsia, 30, 60 e 90 minutos, em cada um dos grupos do experimento I.....	27
Tabela 2 – Resultados referentes às variáveis analisadas no teste de campo aberto, exploração horizontal e exploração vertical, em cada um dos grupos experimentais do experimento I.....	29
Tabela 3 - Resultados referentes às variáveis analisadas no teste de catalepsia, 30, 60 e 90 minutos, em cada um dos grupos do experimento II.....	31
Tabela 4 – Resultados referentes às variáveis analisadas no teste de campo aberto, exploração horizontal e exploração vertical, em cada um dos grupos experimentais do experimento II.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CA	Campo Aberto
CEUA	Comissão Ética do Uso de Animais
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
L-dopa	Levodopa
NO	Oxido Nítrico
NOS	Sintase de Oxido Nítrico
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
3 OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 Animais	20
4.2 Drogas	20
4.3 Experimentos e grupos experimentais	20
4.3.1 Experimento I	20
4.3.2 Experimento II	21
4.4 Avaliação funcional dos animais	23
4.4.1 Teste de catalepsia na barra	23
4.4.2 Teste do campo aberto	24
4.5 Descarte dos animais	25
4.6 Análise estatística	25
4.7 Aspectos éticos	26
5 RESULTADOS	27
5.1 Experimento I	27
5.1.1 Teste de Catalepsia	27
5.1.2 Campo aberto	28
5.2 Experimento II	30
5.2.1 Teste de Catalepsia	30
5.2.2 Campo aberto	32
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	44

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença crônica e degenerativa do sistema nervoso central. Evolui de forma lenta e progressiva, sendo caracterizada por bradicinesia, rigidez muscular, tremor em repouso entre outros sinais e sintomas motores (KALIA; KALIA; LANG, 2015).

É a segunda doença neurodegenerativa mais comum, acomete em média 1% da população acima dos 55 anos de idade, caracterizada pela degeneração progressiva dos núcleos da base, substância negra, das vias dopaminérgicas nigroestriadas e pelo aparecimento de sintomas motores (LEES; HARDY; REVESZ, 2009).

Relaciona-se com perda gradual de células nervosas produtoras de dopamina (DA), desequilíbrio de neurotransmissores no cérebro dando início a uma cascata de complicações no corpo, tais como tremores, distúrbios gastrointestinais, problemas motores e declínio cognitivo (ALI *et al.*, 2016).

A perda de dopamina nos neurônios, provoca desequilíbrio entre o sistema dopaminérgico e o sistema colinérgico nos gânglios basais, acarretando em disfunção de movimento e tremor (JOYCE, 1993). Além da perda de terminais dopaminérgicos nigroestriatais e deficiente armazenamento vesicular de dopamina nos terminais restantes (GOLDSTEIN; KOPIN; SHARABI, 2014).

No estriado (núcleo caudado e putâmen), acetilcolina (Ach) e dopamina interagem fortemente e desempenham um papel importante no controle motor normal (CALABRESI *et al.*, 2006). Neurônios dopaminérgicos mesostriatais e interneurônios colinérgicos participam da sinalização do significado motivacional de estímulos e regulam a plasticidade do estriado (THRELFELL; CRAGG, 2011).

O desequilíbrio da transmissão de acetilcolina e dopamina no sistema nigroestriatal é a base patogênica das desordens extrapiramidais. De acordo com a clássica hipótese clínica, a diminuição da atividade do sistema dopaminérgico é paralela a hiperfunção do sistema colinérgico (DAGAEV *et al.*, 2004).

A Levodopa é o tratamento padrão ouro para os problemas motores da doença de Parkinson, particularmente nos estágios iniciais. No entanto, ela não melhora todos os sintomas e não reduz a progressão da doença (QUIK *et al.*, 2015).

Está claro que a liberação de acetilcolina depende de um controle inibitório contínuo de dopamina, mediante sua ação sobre os receptores de dopamina do tipo D2 presentes nos interneurônios. A diminuição da atividade dopaminérgica resulta no aumento da liberação de acetilcolina e, portanto, no excesso de estimulação dos receptores muscarínicos do estriado (ALFARO *et al.*, 2005).

Os receptores muscarínicos de acetilcolina pertencem à família de receptores acoplados à proteína G. Há cinco subtipos de receptores muscarínicos: M1, M2, M3, M4 e M5, que são subdivididos em duas classes distintas: M1, M3 e M5 estão ligados a via proteína G para ativar a fosfolipase-C e mobilizar o cálcio intracelular e M2 e M4 estão ligados a proteína G para inibir a adenilatociclase, reduzindo a concentração de adenosina 3',5'-monofosfato conhecida como AMP intracelular (LANGMEAD; WATSON; REAVILL, 2008).

Receptores muscarínicos subtipo M1 estão localizados no córtex, hipocampo, estriado e tálamo, encontrados nos axônios pós-sinápticos. M2 encontram-se predominantemente no tálamo, córtex, hipocampo e estriado, nos terminais sinápticos colinérgicos. M3 encontram-se no córtex e hipocampo. M5 localizam-se muito discretamente na substância nigra. Em particular, o subtipo M4 tem sido encontrado em muitas regiões do cérebro, como córtex e hipocampo, porém, em abundância no estriado, atuando no controle da liberação de dopamina (LANGMEAD; WATSON; REAVILL, 2008).

AFDX 384 demonstra elevada afinidade para receptores muscarínicos do subtipo M2 e M4 (MILLER; GIBSON; MCKINNEY, 1991), com efeito em atenuar o comprometimento de memória induzido por escopolamina e é capaz de restaurar déficits cognitivos (VANNUCCHI *et al.*, 1997).

Neste trabalho foi avaliado o efeito do AFDX 384, antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina M2/M4, na catalepsia induzida por inibidores de dopamina e óxido nítrico. Analisaram-se as possíveis alterações no comportamento motor de camundongos e a interação destes neurotransmissores, por meio do teste do Campo Aberto (CA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Doença de Parkinson é caracterizada por bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural. Achados clínicos importantes são: distúrbio da marcha, face em máscara, alteração da voz, disartria, disfunção olfatória, hipotensão ortostáticas, seborréia, disfunção sexual, dores, parestesias, disfagia, incontinência urinária, micrografia, distúrbios do sono, depressão, demência entre outras (PERKIN, 1998).

O parkinsonismo é definido como uma das doenças da vasta categoria que apresentam diminuição da neurotransmissão dopaminérgica nos núcleos da base, classificadas em Parkinsonismo primário, secundário, plus e heredodegenerativas (LEWIS; PEDLEY, 2007).

Neurônios colinérgicos intrínsecos da via nigroestriatal estão envolvidos na doença de Parkinson, a dopamina atua primariamente como neurotransmissor inibidor na via e a acetilcolina atua como estimulante (RANG *et al.*, 2004).

A abordagem terapêutica tem por objetivo controlar os sintomas principais, dar melhor qualidade de vida ao paciente e permite sua integração com o meio social e familiar (LIBERMAN, 1998).

O tratamento dos sintomas da doença de Parkinson com drogas predomina a terapia farmacológica e são altamente efetivos em tratar estágios iniciais da doença (JENNER, 2003).

A Levodopa corresponde ao precursor imediato da dopamina e, ao contrário dela, atravessa a barreira hematoencefálica, é convertida a dopamina pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase, como esta enzima existe em quantidade muito maior nos tecidos periféricos que no cérebro, é preciso usar doses elevadas de levodopa para atingir níveis terapêuticos do fármaco no sistema nervoso central (KOROLKOVAS, 2002).

Todavia, a utilização de drogas dopaminérgicas associam-se a efeitos colaterais adversos, tais como náusea, vômito, hipotensão, além de uma série de complicações relacionadas ao tratamento em longo prazo, as quais aumentam em severidade com a progressão da doença (JENNER, 2003).

Os benefícios da terapia com Levodopa muitas vezes diminuem com o tempo, alguns efeitos adversos podem complicar o tratamento em longo prazo. Por isso é associado a outros fármacos como a carbidopa, amantadina e a selegilina, que

demonstram bons resultados na progressão da doença, além do suporte fisioterapêutico e psicoterápico que são indicados para manutenção de uma melhor qualidade de vida (BRAUNWALD *et al.*, 2002).

As demais terapias utilizadas tratam os sintomas neuromotores e não modificam significativamente a progressão da doença. Como decorrência, há a necessidade de ampliação de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP com novas manipulações que sejam capazes de produzir agentes com ação anti-parkinsonianas em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previna o surgimento de discinesias (JENNER, 2003).

Evidências clínicas tem mostrado que as estatinas têm efeitos evidentes sobre a cognição, demência e Doença de Parkinson progressiva, embora foram observados resultados conflitantes e os mecanismos exatos permanecem obscuros (BECKER; JICK; MEIER, 2008).

O sistema colinérgico e sua neurodegeneração associada com doenças neurodegenerativas, tais como Doenças de Parkinson e doença de Alzheimer obtém uma atenção considerável. Receptores muscarínicos, um dos elementos importantes do sistema colinérgico, têm sido amplamente explorado. Estes são receptores acoplados à proteína G que incluem cinco subtipos M1 a M5 (BYMASTER *et al.*, 2003).

Com a perda dos neurônios dopaminérgicos, a homeostase existente entre ambos neurotransmissores se perde, ocorrendo excessiva atividade dos neurônios colinérgicos. Sugere-se que esta hiperatividade associada com a falta de dopamina, leva aos sintomas da DP (RANG *et al.*, 2004).

Dentre os cinco subtipos do sistema muscarínico os receptores que estão localizados na membrana pós-sináptica são os mais estudados e abundantes no córtex cerebral, amígdala, putâmen, caudado e hipocampo (WANG *et al.*, 2008).

A inibição seletiva de receptores M4 pode resultar em um aumento de sinalização do receptor de dopamina D1, que por sua vez, levaria a uma exigência reduzida de levodopa, a terapia padrão para Parkinson (OLIANAS; ONALI, 1999).

Dopamina e acetilcolina possuem potente interação no estriado, em vários níveis, fazendo a regulação da liberação dos neurotransmissores pré-sinápticos e os efeitos pós-sinápticos nas células alvo. A acetilcolina liberada de interneurônios colinérgicos agindo em ambos os receptores, nicotínicos e muscarínicos, é responsável por modulações na transmissão neuronal. (THRELFELL; CRAGG, 2011).

A interação varia de um modo que depende da frequência de ativação pré-sináptica, influenciando nas alterações discretas das sinapses em atividade neuronal. Esta modulação da transmissão da acetilcolina no estriado ocorre por meio de diferentes perfis de receptores nicotínicos e muscarínicos no núcleo caudado-putâmen comparado ao núcleo accumbens, que podem acabar permitindo direcionamentos específicos na região de função estriatal (THRELFELL; CRAGG, 2011).

A dopamina (DA) forma uma população de neurônios relativamente pequena, um neurônio dopaminérgico que quando projetado para o estriado, forma um mandril muito denso, ocupando até 5,7% do volume do estriado, com uma elevada densidade de brotamento axonal, formando sinapse aproximadamente a cada 10-20 μm . Além disso, ele faz milhares de sinapses, com magnitude sobre outros neurônios do SNC (MATSUDA *et al.*, 2009).

Os tratamentos de substituição tanto de dopamina quanto os anticolinérgicos são capazes de aliviar os efeitos debilitantes e sintomas motores da doença de Parkinson (PISANI, 2003). A nível pós-sináptico, DA e Ach pode ter efeitos opostos sobre a excitabilidade dos neurônios de saída estriatal e corticostriatal (CALABRESI *et al.* 2007).

O efeito benéfico do tratamento anticolinérgico também pode ocorrer na substância nigra, em que os receptores muscarínicos influenciam diretamente a descarboxilação de levodopa no estriado (IZURIETA-SANCHEZ *et al.*, 2000).

Antagonistas muscarínicos não seletivos são utilizados como fármacos anti-parkinsonianos, no entanto, existem cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-5). Receptores M4 estão implicados em aspectos da função motora e tem sido sugerido que os antagonistas M4 pode ser usado como tratamento para o parkinsonismo (BETZ *et al.*, 2007).

Devido a ampla distribuição nos tecidos periféricos e centrais, receptores muscarínicos desempenham um papel em doenças tais como o glaucoma, a bradicardia, a asma, a psicose, doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (FELDER *et al.*, 2000).

Os receptores do subtipo M4 são abundantes em neurônios estriatais de ratos e também estão presentes no hipocampo dos roedores e compõem importantes vias de sinalização inibitórias e ou estimulatórias para a formação da memória, juntamente com receptores M1 e M2 (CAULFIELD, 1993).

Na maioria das células neuronais, os receptores M1, M3, M5 são acoplados à fosfolipase. Este, por sua formação de diacilglicerol que subsequentemente ativa a proteína cinase C, aumenta o inositol trifosfato liberando cálcio intracelular. Em contraste, os receptores M2 e M4 são acoplados negativamente à adenilil ciclase (PERALTA *et al.*, 1988).

Aproximadamente 45% dos receptores muscarínicos do estriado são do subtipo M4, 92% dos receptores muscarínicos M4 estão nos neurônios nigro-estriatais (LEVEY *et al.*, 1997). No entanto, com a abundância de receptores M4 encontrados no estriado, e por seu importante papel demonstrado na função motora, supõe-se que antagonistas de receptores muscarínicos M4 podem ser úteis na restauração do equilíbrio entre dopamina e acetilcolina e utilizado como tratamento na DP (LANGMEAD; WATSON; REAVILL, 2008).

O subtipo M4 apresenta um alvo potencial para a doença de Parkinson, antagonistas seletivos de M4 podem demonstrar efeitos terapêuticos benéficos sem efeitos colaterais colinérgicos indesejáveis. Em resumo, compostos sintetizados apresentam a seletividade para o receptor muscarínico subtipo M4, estes compostos podem ser usados como uma ferramenta para estudos farmacológicos para a identificação do receptor muscarínico M4 (BÖHME *et al.*, 2002).

Anticolinérgicos utilizados clinicamente não possuem seletividade particular pelos subtipos de receptores muscarínicos, aliado às evidências do importante papel na função motora dos receptores muscarínicos M4, é necessário investigar a possível utilidade terapêutica de antagonistas muscarínicos seletivos a esse subtipo de receptores e seus possíveis efeitos em modelos animais (BETZ *et al.*, 2007).

No sistema nervoso central a produção de óxido nítrico (NO) envolve-se em diversos fatores fisiológicos e processos patológicos, desde a regulação de plasticidade sináptica para controlar o apetite, o sono, a temperatura corporal, secreção hormonal, comportamento motor, entre outros fatores cognitivos e funções fisiológicas (CALABRESE *et al.*, 2007; EDWARDS; RICKARDS, 2007).

O óxido nítrico é um gás de radicais livres que atua como um mensageiro intercelular ou um "neurotransmissor atípico" (SNYDER; BREDT, 1991). Neurotransmissor, sintetizado a partir do aminoácido L-arginina (L-arg), pelo óxido nítrico sintase (NOS), composto de enzimas (CALABRESE *et al.*, 2007).

Alem disso é um modulador de processos de captação e liberação de dopamina (SALUM *et al.*, 2008), implicado em patologias dopaminérgicas como doença de Parkinson e esquizofrenia (GUIX *et al.*, 2005). A administração aguda sistêmica ou intra-estriatal de óxido nítrico sintase (NOS) causa catalepsia em roedores (DEL BEL *et al.*, 2010).

Antagonistas de receptores D1 estimula a atividade de inibidor não seletivo da sintase de oxido nítrico, enquanto que os antagonistas dos receptores D2 têm o efeito oposto (ALTAR *et al.*, 1990; MORRIS *et al.*, 1997; SAMMUT *et al.*, 2007).

A inibição da formação de NO interrompe o comportamento motor exploratório no teste do campo aberto e produz catalepsia (MARRAS *et al.*, 1995; DEL BEL *et al.*, 2010).

Inibidores da NOS, suprimem a atividade locomotora induzida por agonistas de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂. Há hipótese de que a atividade contínua ou tônica da NOS constitutiva é necessária para que ocorram movimentos normais do corpo. A administração sistêmica de antagonistas de receptores da dopamina do tipo D₁ diminui a atividade da NADPH-d em neurônios estriatais, enquanto que antagonistas de receptores do tipo D₂ produzem o efeito oposto (MORRIS *et al.*, 1997).

O AFDX 384 é visto como um possível alvo seletivo para estratégias terapêuticas destinadas a melhorar os déficits de memória associado à idade, seu efeito sobre a liberação de acetilcolina e de comportamento, oferece mais suporte em relação à idade e prejuízo cognitivo, hipofunção colinérgica e indica o bloqueio dos receptores muscarínicos pré-sináptico (VANNUCCHI, 1997).

A seletividade de ligação de AFDX 384 foi avaliada com receptores muscarínicos humanos clonados (M2-M4) em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1). A análise de Scatchard com as células CHO confirmou a elevada afinidade para os receptores M2 e M4 (MILLER; GIBSON; MCKINNEY, 1991). AFDX-384 reverte o comprometimento induzido pela escopolamina de memória e reconhecimento (VANNUCCHI *et al.*, 1997).

Além disso, AFDX 384 demonstra a presença de câmbio em muscarínicos pré-sinápticos, função do receptor no córtex e hipocampo. Após a aplicação de AFDX 384 há aumento na liberação de ACh impedindo a amnésia, o efeito da escopolamina restaura a hipofunção colinérgica, sendo adicionado a lista de potenciais agentes terapêuticos para o envelhecimento cerebral (VANNUCCHI; PEPEU, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar o efeito do AFDX 384, um antagonista de receptores M2/M4 de acetilcolina, nas alterações motoras induzidas por dois modelos farmacológicos da doença de Parkinson.

3.2 Específicos

- a) avaliar o efeito antagonista do AFDX 384 com seletividade para M2 e M4 no comportamento de catalepsia em camundongos, induzidos por inibição de receptores de dopamina;
- b) avaliar o efeito do antagonista de receptor muscarínico de acetilcolina, AFDX 384 no comportamento de catalepsia em camundongos, induzidos por inibição da NOS;
- c) avaliar a interação entre os neurotransmissores de acetilcolina, dopamina e óxido nítrico sobre o comportamento motor de camundongos, especificamente em relação à exploração horizontal e vertical, por meio do teste do Campo Aberto.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos suíços, machos, procedentes do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pesando entre 20-30g. Os animais foram mantidos no biotério de biofisiofarmacologia da UFMS com água e comida a vontade até o início dos testes. A temperatura ambiente foi conservada em $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. O ciclo de luz foi de 12/12 horas, com luzes acesas às 06:00 e apagadas às 18:00 horas.

4.2 Drogas

Foram utilizados antagonistas de receptores de dopamina: haloperidol 1mg (Haldol-Janssen-Cilag); inibidores da sintase do óxido nítrico: N^{G} -nitro-L-arginine (L-noarg - Sigma); antagonista de receptores de acetilcolina M2/M4, AFDX 384 (Sigma). As drogas foram dissolvidas em solução salina a 0,9%.

4.3 Experimentos e grupos experimentais

Ocorreram dois experimentos, com seis grupos por experimento, cada grupo foi constituído de oito camundongos suíços. Cada animal foi utilizado somente em um dos grupos experimentais, como descrito a seguir.

4.3.1 Experimento I

Efeito do AFDX 384 nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-noarg:

Neste experimento os animais receberam injeção via intraperitoneal (i.p.) de salina ou L-noarg (40mg/kg), seguida pela aplicação via i.p. de salina ou de AFDX 384 (2,5 ou 5,0mg/kg) após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n=8): os animais receberam solução salina 0,9% (i.p.), após 30 minutos, receberam novamente salina 0,9% (i.p.).

Grupo 2 (n=8): os animais receberam solução salina 0,9% (i.p.) e após 30 minutos uma dose de AFDX 384, 2,5mg/kg (i.p.).

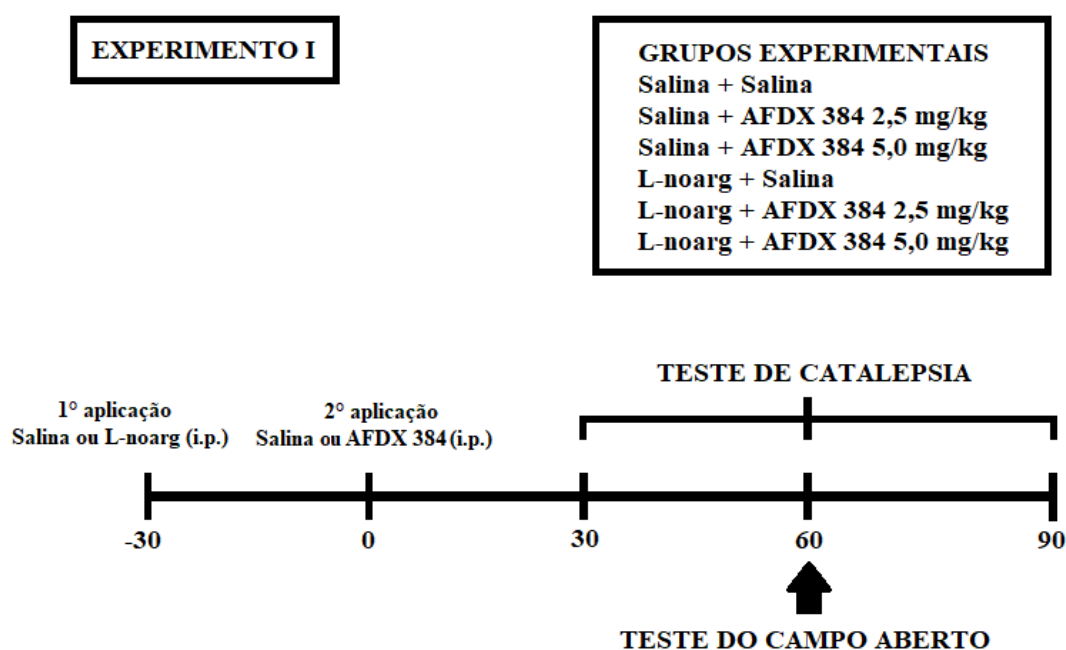
Grupo 3 (n=8): os animais receberam solução salina 0,9% (i.p.) e após 30 minutos uma dose de AFDX 384 5,0mg/kg (i.p.).

Grupo 4 (n=8): os animais receberam L-noarg 40mg/kg (i.p.) e após 30 minutos, uma dose de solução salina 0,9% (i.p.).

Grupo 5 (n=8): os animais receberam L-noarg 40mg/kg (i.p.) e após 30 minutos, uma dose de AFDX 384 2,5mg/kg (i.p.).

Grupo 6 (n=8): os animais receberam L-noarg 40mg/kg (i.p.) e após 30 minutos, uma dose de AFDX 384 5,0 mg/kg (i.p.).

Figura 1: Representação ilustrativa esquemática do experimento I.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Experimento II

Efeito de AFDX 384 nas alterações do comportamento motor induzidas pelo haloperidol:

Neste experimento os animais receberam injeção via intraperitoneal (i.p.) de salina ou haloperidol (1mg/kg), seguida pela aplicação de salina 0,9% (i.p.) ou de AFDX

384 (2,5 e 5,0mg/kg), após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n=8): Os animais receberam solução salina 0,9% (i.p.) e após 30 minutos, outra dose de salina (i.p.) 40mg/kg.

Grupo 2 (n=8): Os animais receberam solução salina 0,9% (i.p.) e após 30 minutos uma dose de AFDX 384 2,5mg/kg (i.p.).

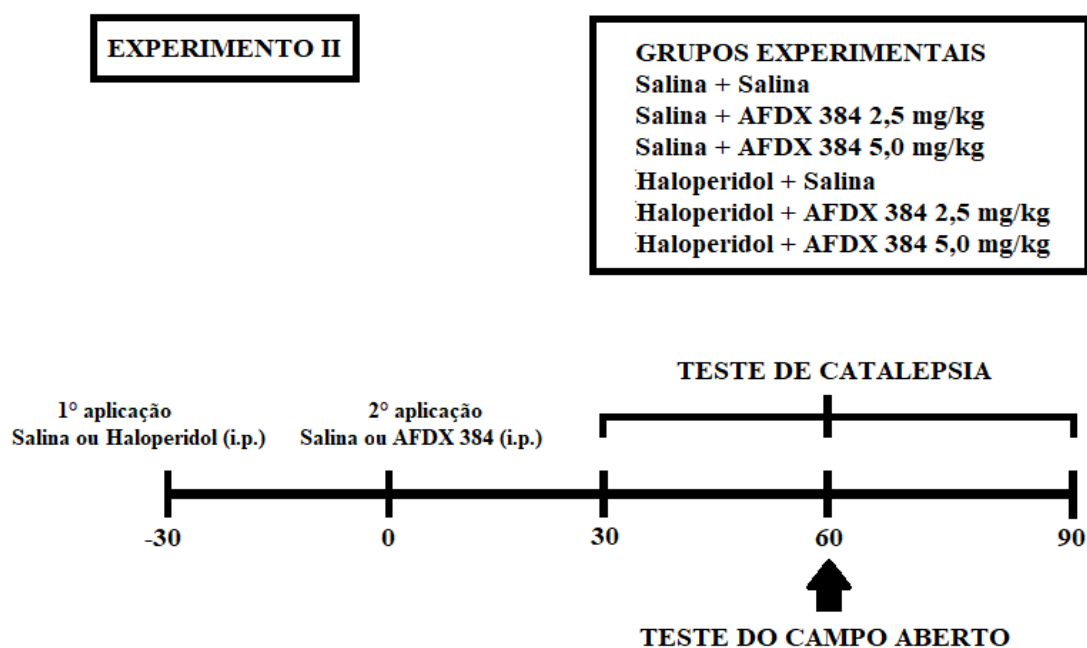
Grupo 3 (n=8): Os animais receberam solução salina 0,9% (i.p.) e após 30 minutos uma dose AFDX 384(5,0mg/kg) (i.p.).

Grupo 4 (n=8): Os animais receberam haloperidol (i.p.) 1mg/kg e após 30 minutos uma dose de solução salina 0,9% (i.p.)

Grupo 5 (n=8): Os animais receberam haloperidol (i.p.) 2mg/kg e após 30 minutos uma dose de AFDX 384 (i.p.) 2,5mg/kg.

Grupo 6 (n=8): Os animais receberam haloperidol (i.p.) 2mg/kg e após 30 minutos uma dose de AFDX 384 (i.p.) 5,0mg/kg.

Figura 2: Representação ilustrativa esquemática do experimento II.



Elaboração: Fonte própria.

4.4 Avaliação funcional dos animais

A avaliação funcional dos animais após a aplicação das drogas foi realizada por meio do teste de catalepsia (ZARRINDAST; MODABBER; SABETKASAI, 1993) e do teste do campo aberto (WALSH, 1976; WHIMBEY, 1967), realizados no laboratório de Biofisiofarmacologia da UFMS. Os testes de comportamento foram realizados sempre no mesmo horário e local, como descritos a seguir.

4.4.1 Teste de catalepsia na barra

A catalepsia foi analisada por meio do método da barra, o camundongo foi colocado com ambas as patas anteriores sobre uma barra horizontal (diâmetro de 0,5cm), elevada 4,5cm do solo (SANBERG *et al.*, 1988). Foi registrado o tempo em segundos em que o animal permaneceu nesta posição, até um tempo máximo de 300 segundos (ZARRINDAST; MODABBER; SABETKASAI, 1993), foi permitido três tentativas de colocação do animal em posição cataléptica. O tempo de catalepsia foi considerado completo quando as patas anteriores tocaram o solo ou quando o camundongo subiu com ambas as patas na barra. As medidas foram realizadas nos tempos de 30, 60 e 90 minutos seguida da administração das drogas.

Figura 3: Teste de Catalepsia na barra



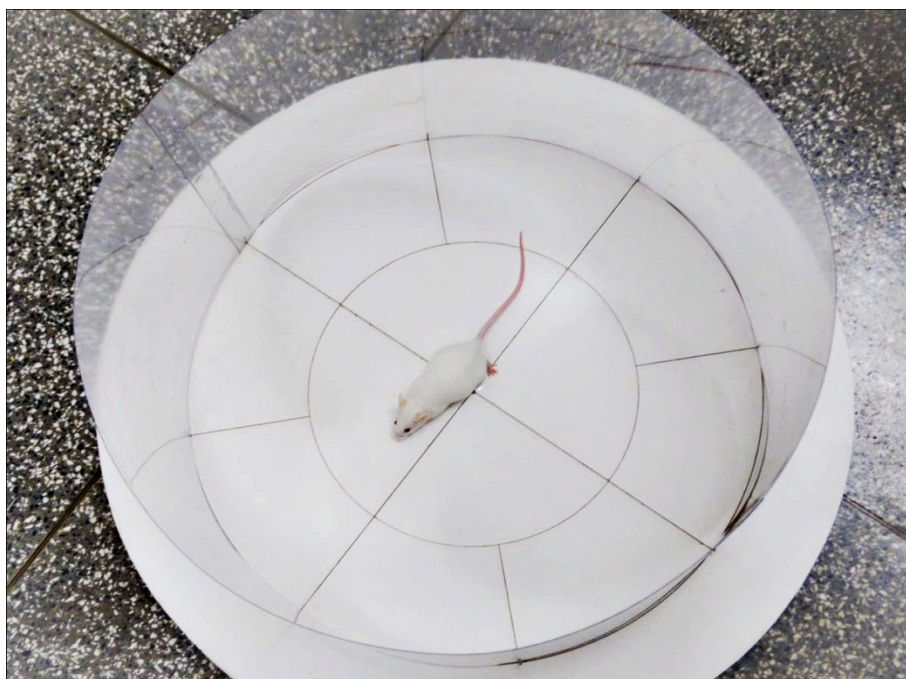
Elaboração: Fonte própria.

4.4.2 Teste do campo aberto

Este teste foi utilizado para avaliar o comportamento motor do animal. O teste foi descrito e utilizado por Calvin S. Hall na década de 1930, o seu uso estendido e modificado por P. L. Broaderhurst na década de 1960, em estudos sobre o medo e a herança do comportamento, evidenciou que no teste de campo aberto, há uma forte correlação positiva entre o comportamento de deambulação e o comportamento exploratório do rato (GRAY, 1987). Outros parâmetros de avaliação foram acrescentados ao teste, sendo que atualmente, mais de trinta itens estão neste teste (WALSH, 1976).

Os parâmetros avaliados durante a realização do teste do campo aberto foram: a frequência dos comportamentos de exploração horizontal e vertical, em uma arena cilíndrica, de 40cm de diâmetro, paredes de acrílico translúcido, 30cm de altura e colocada sobre uma base de madeira recoberta de fórmica de cor branca, a qual é subdividida em 12 quadrantes de $104,7\text{cm}^2$ cada. O teste do campo aberto foi realizado após o teste de catalepsia, aos 60 minutos após a administração das drogas, foi realizada higienização do campo aberto com álcool 70% a cada realização dos testes.

Figura 4: Teste do campo aberto - Deslocamento horizontal



Elaboração: Fonte própria.

Figura 5: Teste do campo aberto - Deslocamento vertical



Elaboração: Fonte própria.

4.5 Descarte dos animais

Após os testes de comportamento, os animais foram eutanasiados com uso da técnica de deslocamento cervical e encaminhados para incineração por meio do sistema de coleta de lixo biológico da UFMS.

4.6 Análise estatística

Os dados referentes ao tempo de catalepsia foram transformados em Log_{10} para a normalização das amostras de dados, uma vez que as amostras com os dados brutos não passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A comparação entre os momentos de análise em relação ao tempo de catalepsia foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo teste de Tukey. Já a comparação entre os grupos experimentais, em relação ao tempo de catalepsia e aos comportamentos de exploração horizontal e vertical, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido por meio do pós-teste de Tukey. Os demais resultados das variáveis analisadas

neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando o “Software” SigmaPlot versão 12.5 considerando o nível de significância de 5% (NORMAN; STREINER, 1994; SHOTT, 1990).

4.7 Aspectos éticos

Todos os procedimentos e protocolos seguiram as diretrizes aprovadas para o tratamento ético dos animais, de acordo com o Comitê de Ética no uso de animais/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo de número 788/2016 (Anexo A).

5 RESULTADOS

5.1 Experimento I

5.1.1 Teste de Catalepsia

Os resultados referentes ao teste de catalepsia do experimento I está disposto na tabela 1 e figura 6.

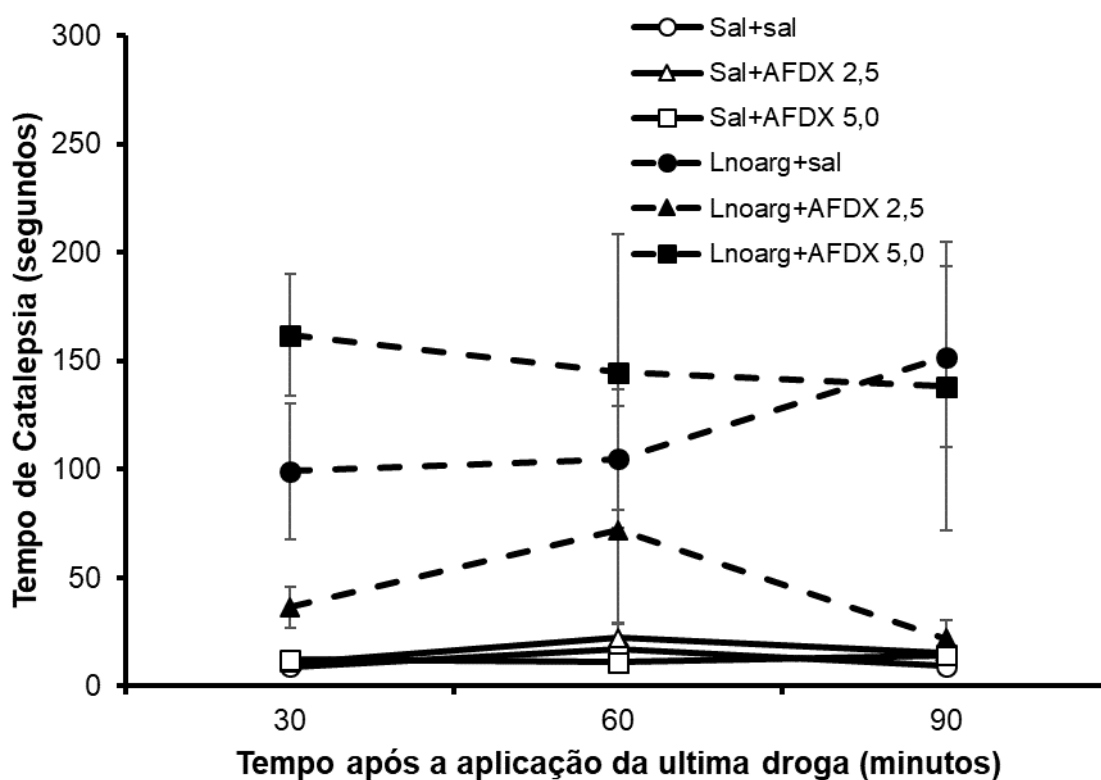
Não houve diferença significativa entre os diferentes tempos de análise, em relação ao tempo de catalepsia (teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, valor de p variando entre 0,179 e 0,894). Por outro lado, houve diferença entre os grupos experimentais, em todos os tempos analisados (teste ANOVA de uma via, $p < 0,001$ em todos os tempos), sendo que os animais que receberam L-noarg+salina apresentaram um tempo maior de catalepsia do que os animais que receberam salina como a primeira droga (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Nos tempos de 30 e 60 minutos após a aplicação das drogas, AFDX, tanto na dose de 2,5mg/kg, quanto na dose de 5,0mg/kg, não foi capaz de reverter a catalepsia induzida pelo L-noarg ($p > 0,05$), todavia, no tempo de 90 minutos após a aplicação das drogas, foi observada uma reversão total da catalepsia, na dose de 2,5mg/kg de AFDX ($p > 0,05$).

Tabela 1: Resultados referentes as variáveis analisadas no teste de catalepsia, 30, 60 e 90 minutos, em cada um dos grupos do experimento I.

Grupo	Tempo após a aplicação das drogas			Valor de p
	30 minutos	60 minutos	90 minutos	
Salina+salina	9,13±3,22b	17,38±11,47b	9,25±2,54c	0,888
Salina+AFDX 2,5	10,80±2,96b	22,20±7,01ab	15,20±5,59c	0,493
Salina+AFDX 5,0	12,20±1,83b	11,20±3,63b	14,40±4,05bc	0,630
Lnoarg+salina	99,25±31,30a	104,75±31,90a	152,00±41,86a	0,179
Lnoarg+AFDX 2,5	36,40±9,63ab	72,00±57,07ab	22,00±8,23bc	0,688
Lnoarg+AFDX 5,0	162,00±64,28a	144,80±63,65a	138,40±66,26ab	0,894
Valor de p	<0,001	<0,001	<0,001	

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em números absolutos. Letras minúsculas nas colunas indicam que há diferença significativa entre os grupos (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Figura 6: Gráfico referente ao tempo de catalepsia dos grupos em 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Os símbolos representam à média e as barras ao erro padrão da média.



Elaboração: Fonte própria.

5.1.2 Campo aberto

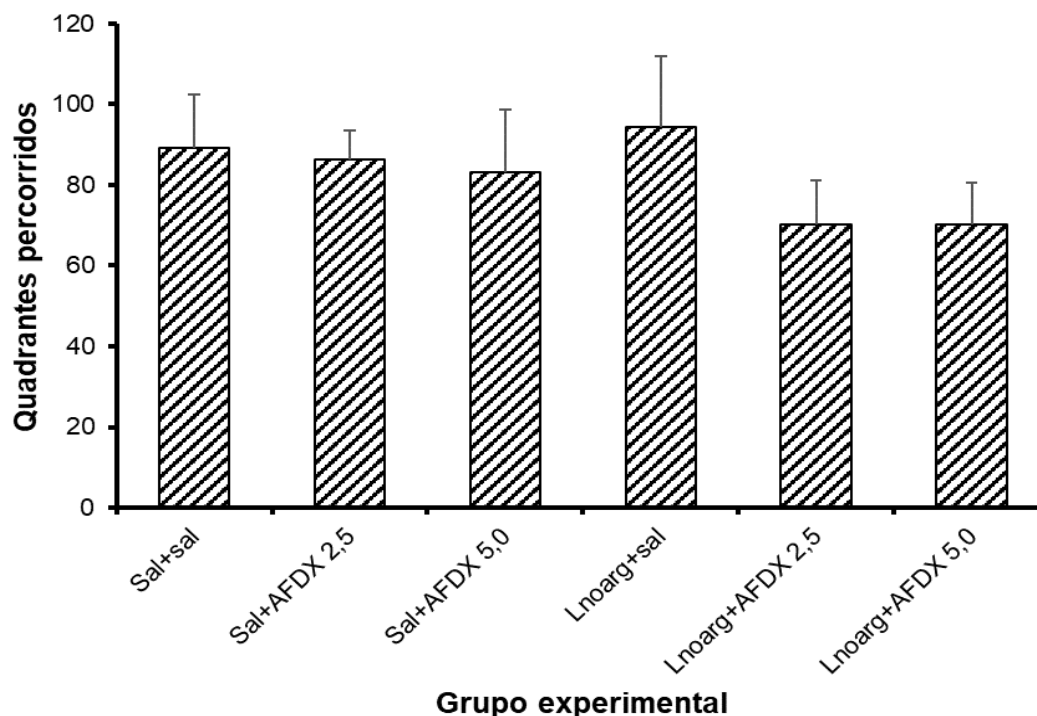
Os resultados do experimento I referentes à exploração horizontal e vertical dos animais no teste do campo aberto, 60 minutos após a aplicação da última droga para cada um dos grupos estão apresentados na tabela 2 e ilustrado nas figuras 7 e 8. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos experimentais, em relação ao comportamento de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e exploração vertical (erguimentos) expressos pelos animais (teste ANOVA de uma via; exploração horizontal: $p=0,790$; exploração vertical: $p=0,155$). Isto indica que L-noarg não levou a alterações motoras nos animais, como avaliado por este teste.

Tabela 2: Resultados referentes às variáveis analisadas no teste de campo aberto, exploração horizontal e exploração vertical, em cada um dos grupos experimentais do experimento I.

CAMPO ABERTO		
Grupo	Exploração horizontal	Exploração vertical
Salina+salina	89,13±13,42a	33,75±4,73a
Salina+AFDX 2,5	86,40±7,17a	31,00±7,30a
Salina+AFDX 5,0	83,20±15,53a	34,80±5,98a
Lnoarg+sal	94,38±17,56a	35,50±9,90a
Lnoarg+AFDX 2,5	70,20±10,87a	9,60±4,16a
Lnoarg+AFDX 5,0	70,20±10,43a	21,00±7,52a
Valor de p	0,790	0,155

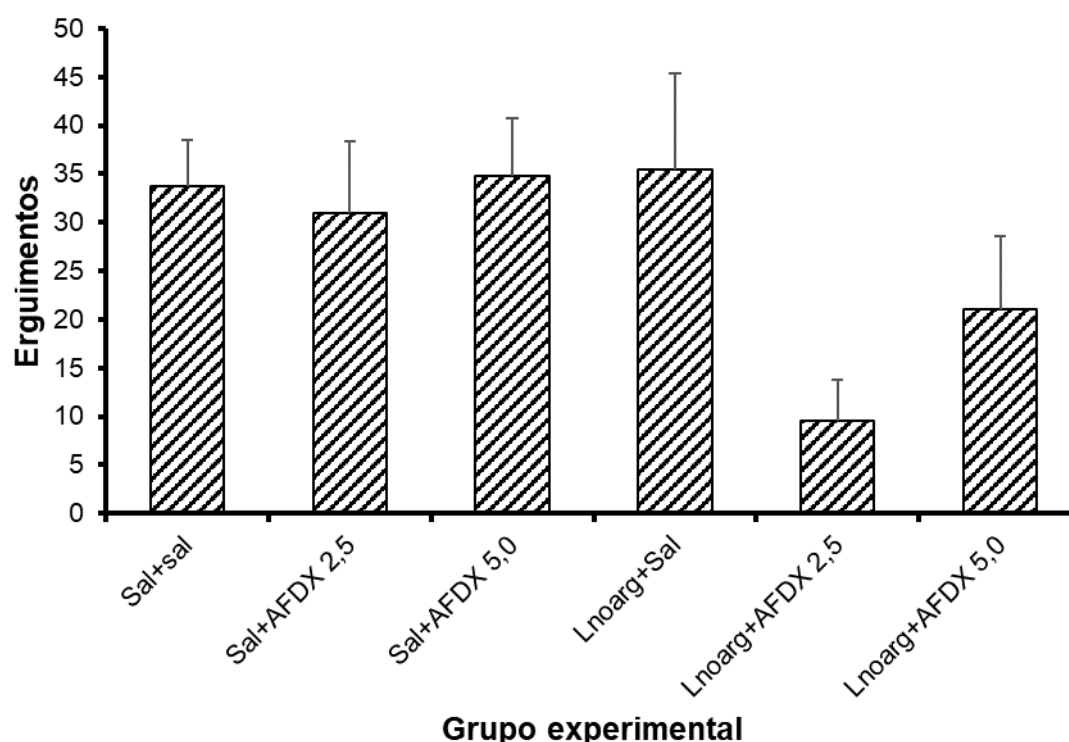
Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em número absoluto. Letras minúsculas nas colunas indicam que não há diferença significativa entre os grupos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Figura 7: Gráfico referente ao número total de quadrantes percorridos, em cada grupo experimental, no teste CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.



Elaboração: Fonte própria.

Figura 8: Gráfico referente ao número de permanência em duas patas em cada grupo experimental no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.



Elaboração: Fonte própria.

5.2 Experimento II

5.2.1 Teste de Catalepsia

Os resultados referentes ao tempo de catalepsia do experimento II, mensurados em 30, 60 e 90 minutos após a aplicação da última droga, estão representados na tabela 3 e na figura 9. Não houve diferença significativa com relação ao tempo de permanência na barra após a aplicação das drogas nos tempos 30, 60 e 90 minutos (teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, valor de p variando entre 0,093 e 0,745). Por outro lado, houve diferença entre os grupos experimentais, em todos os tempos avaliados (teste ANOVA de uma via, 30 minutos: $p=0,003$, 60 e 90 minutos: $p<0,001$), sendo que os animais tratados com haloperidol apresentaram catalepsia maior que os animais dos grupos que receberam salina (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Além disso, AFDX foi capaz de reverter totalmente a catalepsia na dose de 2,5 mg/kg, nos tempos 30

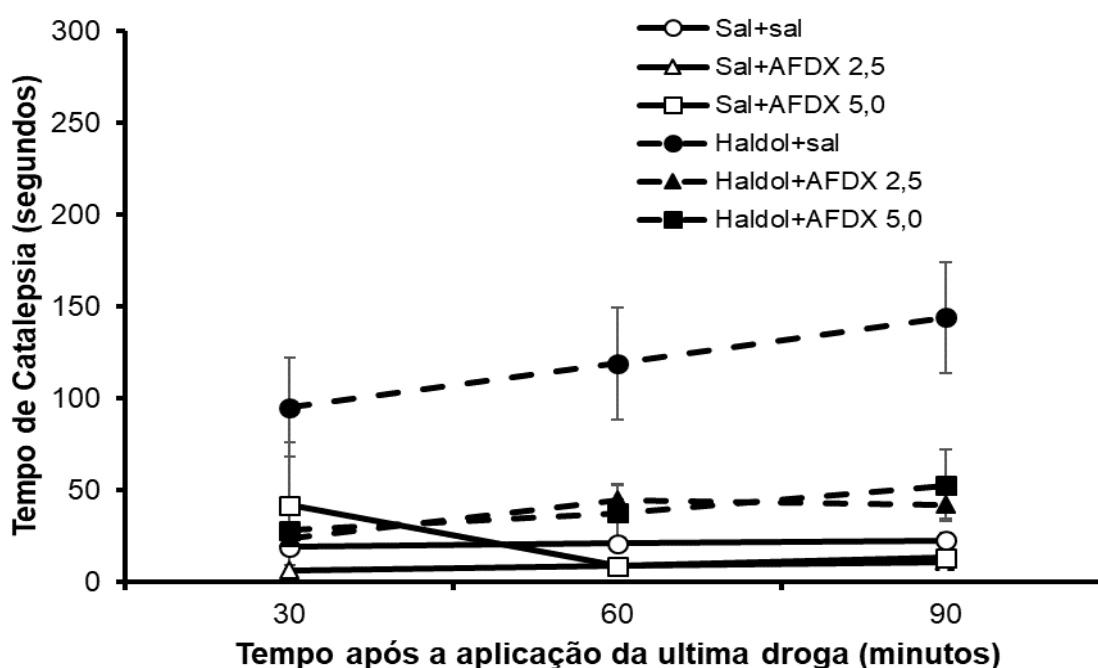
e 90 minutos ($p<0,05$) e na dose de 5,0mg/kg, nos tempos de 60 e 90 minutos ($p<0,05$), sendo que em todos os casos de reversão, o tempo de catalepsia não diferiu significativamente dos animais que receberam salina+salina ($p>0,05$).

Tabela 3: Resultados referentes as variáveis analisadas no teste de catalepsia, 30, 60 e 90 minutos, em cada um dos grupos do experimento II.

Grupo	Tempo após a aplicação das drogas			Valor de p
	30 minutos	60 minutos	90 minutos	
Salina+salina	19,17±4,24ab	21,17±2,94bc	22,50±4,09bc	0,565
Sal+AFDX 2,5	6,40±0,68b	8,80±1,32c	10,80±2,63c	0,171
Salina+AFDX 5,0	41,80±34,59b	8,80±2,52c	13,20±1,66bc	0,553
Haloperidol+salina	95,13±26,98a	119,13±30,60a	144,00±30,34a	0,093
Haloperidol+AFDX 2,5	24,00±14,94b	44,80±7,97ab	42,00±7,37b	0,105
Haloperidol+AFDX 5,0	28,20±3,78ab	37,60±15,81bc	52,40±19,52b	0,745
Valor de p	0,003	<0,001	<0,001	

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em números absolutos. Letras minúsculas nas colunas indicam que há diferença significativa entre os grupos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Figura 9: Gráfico referente ao tempo de catalepsia dos grupos em 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Os símbolos representam a média e as barras o erro padrão da média.



Elaboração: Fonte própria.

5.2.2 Campo aberto

Os resultados referentes à exploração horizontal e vertical do experimento II no teste do campo aberto estão apresentados na tabela 4 e nas figuras 10 e 11. Em relação à exploração horizontal, o número de quadrantes percorridos pelos animais dos grupos que receberam haloperidol como primeira droga foi significativamente menor do que aquele observado nos grupos que receberam salina como a primeira droga (teste ANOVA de uma via, $p < 0,001$, com pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Estes resultados evidenciam uma alteração no comportamento motor dos animais, induzidas por haloperidol, as quais não foram revertidas pelo AFDX, em nenhuma das doses utilizadas.

Em relação à exploração vertical, também houve diferença entre os grupos experimentais (teste ANOVA de uma via, $p < 0,001$), sendo que os animais do grupo Salina+AFDX, na dose de 2,5mg/kg apresentaram um aumento significativo de exploração vertical, quando comparados com o grupo Salina+salina e aqueles grupos que receberam haloperidol como a primeira droga (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Além disso, os animais do grupo Salina+AFDX, na dose de 5mg/kg, apresentaram mais erguimentos que os animais dos grupos Haloperidol+salina e Haloperidol+AFDX 5,0mg/kg ($p < 0,05$). Estes resultados evidenciam que AFDX por si só pode alterar o comportamento motor dos animais, todavia, aumentando a exploração vertical dos animais.

Tabela 4: Resultados referentes as variáveis analisadas no teste de campo aberto, exploração horizontal e exploração vertical, em cada um dos grupos experimentais do experimento II.

CAMPO ABERTO		
Grupo	Exploração horizontal	Exploração vertical
Salina+salina	76,50±3,53a	15,00±2,92bc
Salina+AFDX 2,5	81,40±11,77a	33,80±6,09a
Salina+AFDX 5,0	77,60±5,33a	22,80±8,95ab
Haloperidol+salina	7,75±2,46b	2,63±1,21c
Haloperidol+AFDX 2,5	19,00±3,78b	4,80±1,91bc
Haloperidol+AFDX 5,0	17,80±4,70b	2,00±0,63c
Valor de p	<0,001	<0,001

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão. Variáveis expressas em números absolutos. Letras minúsculas nas colunas indicam que há diferença significativa entre os grupos (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

Figura 10: Gráfico referente ao número total de quadrantes percorridos, em cada grupo experimental, no teste CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.

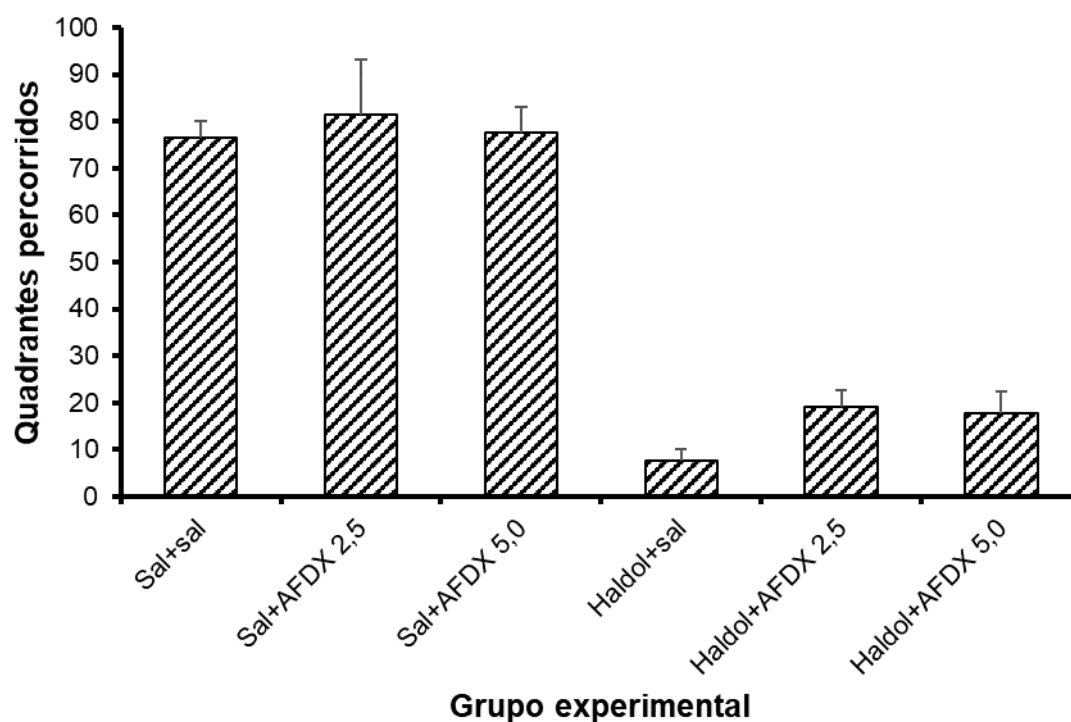
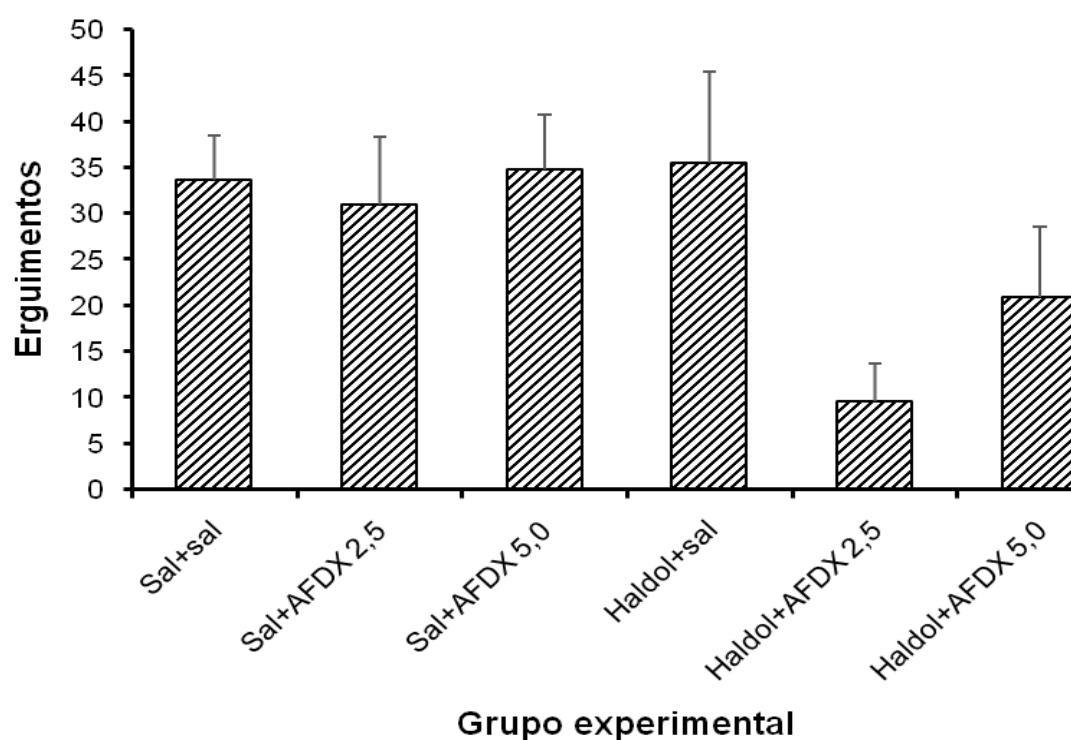


Figura 11: Gráfico referente ao número de permanência em duas patas em cada grupo experimental no teste de CA. As colunas se referem à média e as barras ao erro padrão da média.



6 DISCUSSÃO

No presente estudo o antagonista da sintase de óxido nítrico, L-nórg (Experimento I), demonstrou causar catalepsia nos animais (Figura 6), a catalepsia foi revertida na dose de AFDX 384 2,5 mg/kg no tempo de 90 minutos do teste de catalepsia. Não foi possível observar alterações motoras no teste do campo aberto no experimento I (Figura 7 e 8).

No modelo farmacológico de Parkinson realizado com o antagonista de dopamina, haloperidol (experimento II), apresentou catalepsia induzida (Figura 9) e redução na exploração horizontal e vertical dos camundongos (Figura 10 e 11). A catalepsia foi revertida em ambas as doses de AFDX 384, porém, não houve reversão das alterações motoras observadas no teste de campo aberto.

O fármaco AFDX 384 reduziu a catalepsia e demonstrou melhora no controle motor dos animais, bem como demonstrou aumento do deslocamento vertical por si só no teste do campo aberto.

De acordo com Gunaydin *et al.* (2016), a Levodopa foi identificada como uma opção terapêutica eficiente na doença de Parkinson, obteve-se grande sucesso no curso e no tratamento da doença. No entanto, os efeitos colaterais relacionados à Levodopa limitam o uso terapêutico em alguns pacientes.

Em decorrência disto, neste estudo procurou-se refletir ações anti-parkinsonianas de novos agentes, para que assim, possam ser produzidas novas manipulações farmacológicas capazes de apresentar um potencial terapêutico em todas as fases da doença de Parkinson, sem o declínio da eficácia e que possam também precaver o surgimento de complicações, auxiliando na criação de estratégias interdisciplinares para a qualidade e integralidade da atenção.

Del Bel *et al.* (2010) realizaram um estudo em que foi possível observar que a administração aguda de L-nórg causando catalepsia e sendo atenuada após tratamento sub-crônico. Níveis de NOx foram significativamente reduzidos após o tratamento agudo de L-nórg. que a tolerância aos efeitos catalépticos de L-nórg não depende das mudanças em receptores D2. Eles podem depender, no entanto, de mudanças plásticas nos neurônios nNOS resultando em recuperação parcial da formação de NO no estriado.

De acordo com Del Bel *et al.* (2010), não há alteração na expressão de D2-mRNA no estriado dorsal e áreas relacionadas (Nucleus accumbens e substantia nigra compacta) de animais que se tornaram tolerantes ao efeito cataléptico de L-nórg. Esses resultados sugerem que a tolerância aos efeitos catalépticos do L-nórg, não depende das

mudanças na expressão do receptor D2. Depende, no entanto, de alterações plásticas estriadas que resultam em aumento do número de neurônios que expressam nNOS e parcial recuperação da formação de NO.

A dose de L-noarg do presente estudo foi selecionada com base em estudos que demonstraram catalepsia Del Bel *et al.* (2010) e modificação no comportamento locomotor De Oliveira *et al.* (1997). Além disso, Del Bel e Guimarães (2000) verificaram que animais que se tornaram tolerantes ao tratamento com L-noarg também demonstram resultados semelhantes à catalepsia induzida por haloperidol.

Betz *et al.* (2007) verificaram em sua pesquisa que antagonistas muscarínicos não seletivos têm sido utilizados durante anos como fármacos anti-parkinsonianos. Em contrapartida, Vannucchi *et al.* (1997) demonstraram que com uma concentração adequada de antagonista muscarínicos seletivos sobre receptores inibitórios pré-sinápticos, neurônios colinérgicos de ratos idosos podem liberar tanta acetilcolina quanto ratos jovens.

Em virtude disto a administração de um antagonista seletivo de M2/M4 como o fármaco AFDX 384 pode, portanto, ter potencial importância terapêutica, uma vez que pode restaurar comportamentos cognitivos e motores em animais com idade avançada.

De acordo com Alfaro *et al.* (2005), a liberação de acetilcolina depende de um controle inibitório contínuo de dopamina, mediante sua ação sobre os receptores de dopamina do tipo D2, presentes nos interneurônios colinérgicos. A diminuição da atividade dopaminérgica resulta no aumento da liberação de acetilcolina, bem como no excesso de estimulação dos receptores muscarínicos do estriado.

Miller, Gibson e Mckinney (1991) avaliaram em seu estudo a seletividade de ligação do fármaco AFDX 384 com os receptores muscarínicos humanos clonados (M2-M4) em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1). A análise de Scatchard confirmou que há elevada afinidade para os receptores do tipo M2 e M4.

Corroborando com Miller, Gibson e Mckinney (1991) neste estudo foi possível observar que além da seletividade de AFDX 384 com receptores muscarínicos, o antagonista AFDX 384 reverteu a catalepsia induzida em alguns momentos do estudo e houve melhora no padrão motor constatada pelo aumento de deslocamentos horizontais e verticais.

Dencker *et al.* (2009) verificaram que o subtipo M4 é encontrado em muitas regiões do cérebro, incluindo córtex e hipocampo, porém, em abundância no estriado, desempenhando papel importante no controle motor e no controle da liberação de dopamina. Por este motivo, pode-se afirmar que AFDX 384, antagonista seletivo de M2 e M4 pode auxiliar no tratamento de sintomas motores.

Vannucchi *et al.*, (1997) avaliaram em seu estudo a liberação de acetilcolina cerebral e o desempenho da memória em ratos jovens e idosos. A liberação de acetilcolina foi medida *in vivo* no córtex e no hipocampo de animais que se moviam livremente, em condições basais e na presença de antagonistas muscarínicos. A quantidade de acetilcolina liberada do córtex e hipocampo de ratos idosos foi significativamente reduzida.

AFDX 384 restaurou o desempenho em ambos os testes. Além disso, em ratos jovens AFDX 384 reverteu o comprometimento do reconhecimento de objetos, restaurando a resposta induzida pela escopolamina, um farmaco antagonista de receptores muscarínicos não seletivo.

O efeito do AFDX 384 sobre a liberação e o comportamento da acetilcolina nos ratos idosos intensifica a relação entre hipofunção colinérgica relacionada à idade e o comprometimento cognitivo, indicando o bloqueio dos receptores muscarínicos pré-sinápticos como possível alvo seletivo para estratégias terapêuticas, visando melhorar a resposta cognitiva.

Com base em Vannucchi e Pepeu (1995) foi utilizada a dose de 5mg/kg. Os autores aplicaram injeção via intraperitoneal na dose de 1mg/kg e não causou aumento na liberação de acetilcolina do córtex, enquanto que a dose de 5mg/kg intraperitoneal foi seguida por um aumento significativo e duradouro na liberação de acetilcolina.

No momento em que a dose de 5mg/kg de AFDX 384 foi administrada 10 minutos após a escopolamina, restaurou o reconhecimento de objetos, ou seja, ratos com a aplicação de injeção intraperitoneal de AFDX 384 5mg/kg conseguiram distinguir objetos familiares e novos.

Contrapondo o estudo de Vannucchi e Pepeu (1995) foi possível observar que os resultados obtidos na dose de AFDX 384 2,5mg/kg foram superiores a dose de AFDX 384 5mg/kg. Na dose de 2,5mg/kg houve reversão do quadro de catalepsia no tempo de 90

minutos em ambos os experimentos, em virtude disto, sugere-se que novos estudos sejam realizados com o intuito de constatar a dose ideal levando em consideração que há poucos estudos relacionando o fármaco AFDX 384 ao tratamento de doenças neurodegenerativas e em específico a Doença de Parkinson.

As terapias mais utilizadas tratam sintomas neuromotores, no entanto não modificam significativamente a progressão da Doença de Parkinson, como decorrência, há necessidade de ampliação de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da doença que sejam capazes de produzir agentes com ação anti-parkinsonianas em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previna o surgimento de discinesias.

7 CONCLUSÃO

A partir deste estudo conclui-se que o fármaco AFDX 384, antagonista de M2/M4 de acetilcolina, foi capaz de reduzir a catalepsia induzida por L-noarg e Haloperidol, demonstrando um importante papel no comportamento induzido por inibição de receptores de dopamina.

O L-noarg não causou alterações motoras significativas no teste de campo aberto, enquanto que Haloperidol causou alterações motoras, porém, não houve reversão após a aplicação de AFDX 384. No entanto, AFDX 384 demonstrou aumento no comportamento motor por si só, no teste de campo aberto.

Estes resultados auxiliam no esclarecimento dos efeitos do fármaco AFDX 384 além de contribuir para a busca de novas manipulações farmacológicas para a DP.

8 REFERÊNCIAS

ALFARO, G. L. J. *et al.* La cafeína y los antagonistas de los receptores A_{2a} de la adenosina como posiblesadyuvantes de la terapia anticolinérgica em laenfermedad de parkinson. **Rev. Biomed.** v. 16, n. 2, p. 99-111, Jun. 2005.

ALI, S., YIN, N., ARKAM, R. *et al.* Parkinson Disease-Mediated Gastrointestinal Disorders and Rational for Combinatorial Therapies. **Medical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1, 2016.

ALTAR, A. C., BOYAR, W. C. KIM, HELEN S. Discriminatory roles for D1 and D2 dopamine receptor subtypes in the in vivo control of neostriatal cyclic GMP. **European Journal of Pharmacology**, v. 181, n. 1-2, p. 17-21, 1990.

BECKER, C.; JICK, S. S.; MEIER C. R. Use of Statins and the Risk of Parkinson??s Disease. **Drug Safety**, v. 31, n. 5, p. 399-407, 2008.

BETZ, A. J., MCLAUGHLIN, P. J. BURGOS, M. *et al.* The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptors. **Psychopharmacology**, v. 194, n. 3, p. 347-359, 2007.

BÖHME, T. M., AUGELLI-SZAFRAN, C. E.; HALLAK, H. *et al.* Synthesis and Pharmacology of Benzoxazines as Highly Selective Antagonists at M4Muscarinic Receptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 21, p. 4800-4800, 2002.

BYMASTER, F. P., FELDER, C. C.; TZAVARA, E. *et al.* Muscarinic mechanisms of antipsychotic atypicality. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1125-1143, 2003.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; KASPER, D.L. *et al.* **Harrison Medicina Interna** 15ªed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill; 2002.

CALABRESE V.; MANCUSO C.; CALVANI M.; *et al.* Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci.** v.8, p.766–775. 2007.

CALABRESI, P., PICCONI; B. PARNETTI, L. *et al.* A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine–acetylcholine synaptic balance. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 11, p. 974-983, 2006.

CALABRESI, P., PICCONI, B.; TOZZI, A. et al. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 211-219, 2007.

CAULFIELD, M.P. Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 3, p. 319-379, 1993.

DAGAEV, S. G., KOSMACHEV, A. B.; SOLOV'EVA, N. E. et al. Effects of Cholinoblockers on Acetylcholine Content in Rat Striatum in Neuroleptic-Induced Parkinsonism. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 137, n. 2, p. 164-166, 2004.

DE OLIVEIRA, C. L., DEL BEL, E.; AGUIMARÃES, F.S. Effects of l-NOARG on Plus-Maze Performance in Rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 56, n. 1, p. 55-59, 1997.

DENCKER, D.; JEON, J.; WOLDBYE, D. P. D. *et al.* Catalepsy is attenuated in mutant mice lacking M4 muscarinic acetylcholine receptors in D1 dopamine receptor- expressing cells. **Scandinavian Neuropsychopharmacol**, v. 2, n.17, 2009.

DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Sub-chronic inhibition of nitric-oxide synthesis modifies haloperidol-induced catalepsy and the number of NADPH-diaphorase neurons in mice. **Psychopharmacology**, v. 147, n. 4, p. 356-361, 2000.

DEL BEL, E. A., GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. et al. Tolerance to the cataleptic effect that follows repeated nitric oxide synthase inhibition may be related to functional enzymatic recovery. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 3, p. 397-405, 2010.

EDWARDS, T. M.; RICKARD, N. S. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 3, p. 413-425, 2007.

FELDER, C. C., BYMASTER, F. P.; WARD, J. et al. Therapeutic Opportunities for Muscarinic Receptors in the Central Nervous System. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 23, p. 4333-4353, 2000.

GOLDSTEIN, D. S., KOPIN, I. J.; SHARABI, Y. Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 144, n. 3, p. 268-282, 2014.

GUIX, F. X., URIBESALGO, I.; COMA, M. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005.

GRAY. J. A. The inheritance of fear and stress. **Cambridge University Press**. v. p.57-85. 1987.

GÜNAYDIN, Z. Y., BEKTAŞ, O.; KARAGÖZ, A. et al. Effects of levodopa therapy on global left ventricular systolic function in patients with Parkinson disease. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 128, n. 13-14, p. 528-533, 2016.

IZURIETA-SÁNCHEZ, P., SARRE, S.; EBINGER, G. et al. Muscarinic antagonists in substantia nigra influence the decarboxylation of l-dopa in striatum y, **European Journal of Pharmacology**. v. 399, n. 2-3, p. 151-160, 2000.

JENNER, P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. **Neurology**, v. 61, n. Issue 11, Supplement 6, p. S32-S38, 2003.

JOYCE, J. N. Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. III. Results in Parkinson's disease cases. **Brain Research**, v. 600, n. 1, p. 156-160, 1993.

KALIA, L. V., KALIA, S. K.; LANG, A. E. Disease-modifying strategies for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 11, p. 1442-1450, 2015.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. Depressores do Sistema Nervoso Central. In: **Dicionário Terapêutico Guanabara** 9. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.1.20-1.25, 2002.

LANGMEAD, C. J., WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 232-243, 2008.

LEES A. J., HARDY J., REVESZ T. Parkinson's disease. **Lancet**. v. 373, n. 9680, p. 2055-66. 2009.

LEVEY, A.I., EDMUNDS, S.M.; HEILMAN, C.J. et al. Localization of muscarinic M3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 207-221, 1994.

LEWIS P, R.; PEDLEY, T.A. Merrit tratado de neurologia. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2007, p.768-83.

LIEBERMAN A. Managing the neuropsychiatric symptoms of Parkinson's disease. **Neurology** 1998; 50: 533- 538.

MATSUDA, W., FURUTA, T.; NAKAMURA, K. C. et al. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 444-453, 2009.

MARRAS, R. A., MARTINS, A. P.; DEL BEL, E. A. et al. l-NOARG, an inhibitor of nitric oxide synthase, induces catalepsy in mice. **NeuroReport**, v. 7, n. 1, p. 158-160, 1995.

MILLER J.H.; GIBSON V. A.; MCKINNEY, M. Binding of [3H]AF-DX 384 to cloned and native muscarinic receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 259, n. 2, p.601–607, 1991.

MORRIS, M. E., WATTS, J. J.; IANSEK, R. et al. Quantifying the profile and progression of impairments, activity, participation, and quality of life in people with Parkinson disease: protocol for a prospective cohort study. **BMC Geriatrics**, v. 9, n. 1, 2009.

NORMAN, G. R.; STREINER, D. L. **Biostatistics the bare essentials**. London: Mosby, 1994.

OLIANAS, M. C.; ONALI, P. PD 102807, a novel muscarinic M4 receptor antagonist, discriminates between striatal and cortical muscarinic receptors coupled to cyclic AMP. **Life Sciences**, v. 65, n. 21, p. 2233-2240, 1999.

PERALTA, E. G., ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W. et al. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. **Nature**, v. 334, n. 6181, p. 434-437, 1988.

PERKIN, D. G. **An Atlas of Parkinson's Disease and Related Disorders**. Londres: Parthenon PublishingGroup, 1998, 96p.

PISANI, A. Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: Focus on metabotropic glutamate receptors. **Neuropharmacology**, v. 45, n. 1, p. 45-56, 2003.

QUIK, M., ZHANG, D.; MCGREGOR, M. et al. Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 97, n. 4, p. 399-407, 2015.

SALUM, C., RAISMAN-VOZARI, R.; MICHEL, P. P. et al. Modulation of dopamine uptake by nitric oxide in cultured mesencephalic neurons. **Brain Research**, v. 1198, p. 27-33, 2008.

SAMMUT, S., BRAY, K. E.; WEST, A. R. Dopamine D2 receptor-dependent modulation of striatal NO synthase activity. *Psychopharmacology*, v. 191, n. 3, p. 793-803, 2007.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 12, p. 125-128, 1991.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J.M. et al. K. Distúrbios neurodegenerativos. In: **Farmacologia**. 5.Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.567-571, 2004.

THRELFELL, S.; CRAGG, S. J. Dopamine Signaling in Dorsal Versus Ventral Striatum: The Dynamic Role of Cholinergic Interneurons. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, 2011.

VANNUCCHI, M. G., SCALI, C., KOPF, S. R., *et al.* Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. **Neuroscience**, v. 79, n. 3, p. 837-846, 1997.

VANNUCCHI, M. G.; PEPEU, G. Muscarinic receptor modulation of acetylcholine release from rat cerebral cortex and hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 190, n. 1, p. 53-56, 1995.

SANBERG, P. R., BUNSEY, M. D.; GIORDANO, M. et al. The catalepsy test: Its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748-759, 1988.

SHOTT, S. **Statistics for health professionals**. London: W. B. Saunders Company, 1990.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. T. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WANG, Q., ZENGIN, A.; YING, W. *et al.* Chronic treatment with simvastatin upregulates muscarinic M1/4 receptor binding in the rat brain. **Neuroscience**, v. 154, n. 3, p. 1100-1106, 2008.

ZARRINDAST, M. R., MODABBER, M.; SABETKASAI, M. Influences of different adenosine receptor subtypes on catalepsy in mice. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 257-261, 1993.

ANEXO



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do AF-DX 384, um antagonista de receptores M2/M4 de acetilcolina, nas alterações motoras induzidas por dois modelos farmacológicos da doença de Parkinson", registrada com o nº 788/2016, sob a responsabilidade de **Albert Schiaveto de Souza e Mayara Lourdes Caramel Braga** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 7ª reunião ordinária do dia 12/08/2016.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/08/2016 a 30/03/2018
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	96
Peso/Idade	20 – 30g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central/CCBS/UFMS

Maria Araújo Teixeira
 Coordenadora da CEUA/UFMS
 Campo Grande, 15 de agosto de 2016.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
 fone (67) 3345-7925